

在 Opentrons Flex 工作站使用 QIAseq® FX DNA Library Kit 和 QIAseq® Normalizer Kit 自动化制备全基因组测序文库



作者

Matthew Akana, MS,¹ Frances Slater, PhD,¹ Shu Boles, PhD,² Kinnari Watson, PhD,¹ Opentrons Labworks, Inc., ²QIAGEN, LLC

摘要

随着测序项目的不断扩展和测序技术的持续发展,为了节省宝贵的时间和减少人力资源的消耗,实验室对于简化文库制备流程的需求日益增加。自动化文库制备流程已经成为应对这一挑战的有效策略。同时,文库制备的化学方法也在不断地创新,如支持自动化、缩短工作流程以及减少移液步骤等特点,文库制备过程也变得更加高效。

在本文中,我们将详细介绍如何通过 Opentrons Flex 平台,结合 QIAseq® FX DNA Library Kit 与 QIAseq® Normalizer Kit,实现自动化文库制备,从而更高效地为大肠杆菌、人类基因组以及混合微生物 DNA 制备文库。

重点

- 使用 Opentrons Flex 移液工作站,结合 QIAseq® FX DNA Library Kit 和 QIAseq® Normalizer Kit 进行自动化操作,能够高效地完成 96 个样本的文库制备流程,整个过程仅需 4-5 小时,所需手动操作时间不到 1 小时。

- 该工作流程结束后,我们得到了浓度为 4nM 的、高度均一、标准化的高通量全基因组测序 (WGS) 文库。

介绍

为了应对日益增长的测序需求,越来越多实验室正逐步引入自动化技术,以优化文库制备工作流程。然而,自动化对于许多实验室而言是一项重大投资,并且还需要考虑与使用的化学试剂的兼容性、处理样品的通量、整体工作流程的优化以及需要手动操作的时间等因素。

在本研究中,我们采用了一种自动化的文库制备流程,成功地制备了大肠杆菌 (E.coli)、人类基因组以及混合微生物的 DNA 文库,并在 Opentrons Flex 自动化移液平台上实现了文库的标准化处理,单次处理样本量高达 96 个。

QIAseq® FX DNA Library Kit 通过酶促片段化法和 UDI (双唯一标签法) 简化了 NGS 文库制备步骤。使用 QIAseq® FX DNA Library Kit 将文库标准化至 4nM,无需 qPCR 定量,进一步简化工作流程。

Opentrons Flex 自动化移液平台配备了 Flex 移液器和相应的耗材,以及多种模块,如热循环模块、温度模块、热震荡模块和环形磁力架,多元模块协作运行,使得样本处理的通量达到最高达 96 个样本。

方法

样本

三种全基因组测序文库：(1) 大肠杆菌 (2) 混合微生物群落和 (3) 人类 (更多详细信息请参阅表 1)。

文库制备和标准化

在 Opentrons Flex 上使用 QIAseq® FX DNA Library Kit 工作流程制备全基因组文库 (更多详细信息, 请参阅表 1 和表 2)。使用 QIAseq® Library Normalizer Kit 工作流程 A 和 B 进行文库标准化。

测序

标准化的混合文库在 Illumina MiSeq® (2 x 150 bp) 和 NextSeq® (2 x 75 bp) 上进行测序。

质控

测序之前, 在 Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 Screentape 上测定文库的片段大小和浓度, 并使用 KAPA Library Quantification kit 进行 qPCR 定量。然后将样品变性、稀释, 准备上机测序。

数据分析

测序数据去重后, 将其上传至 Galaxy 平台。在 Galaxy 中使用 fastp 对双端数据进行分析, 然后使用 BWA-mem 进行基因组比对。最后, 使用 Samtools 对对比后的数据进行分析。

表 1. 设备、试剂和样品

设备、试剂和样品	公司 / Cat. No. or SKU
Opentrons Flex NGS Workstation (2 x 8-Channel Pipette configuration)	Opentrons / 991-00116
QIAseq FX DNA Library UDI Kits (96)	QIAGEN / 180479-180482
QIAseq Library Normalizer Kit (96)	QIAGEN / 180605
E. coli Non-Methylated Genomic DNA	Zymo Research / D5016
Human Male Genomic DNA	Promega / G1471
20 Strain Staggered Mix Genomic Material	ATCC / MSA-1003™

表 2. 输入 DNA 和工作流程参数

输入 DNA	重要工作流程参数
100 ng 大肠杆菌	片段化时间: 15 分钟 PCR 循环数: 6 标准化流程: B
1 ng 混合微生物	片段化时间: 14 分钟 (含 2.5 µL FX Enhancer) PCR 循环数: 12 标准化流程: A
100 ng 人类	片段化时间: 15 分钟 PCR 循环数: 6 标准化流程: B

结果

Opentrons Flex NGS 工作站的应用使得 QIAseq® FX DNA Library Kit 和 QIAseq® Normalizer Kit 的自动化操作成为可能。实验室可以根据自身样本处理量的需求,选择两种不同的移液器配置:一种是两个 Flex 8 通道移液器的配置,适合处理最多 48 个样本;另一种是单个 Flex 96 通道移液器的配置,能够应对最多 96 个样本的处理需求。

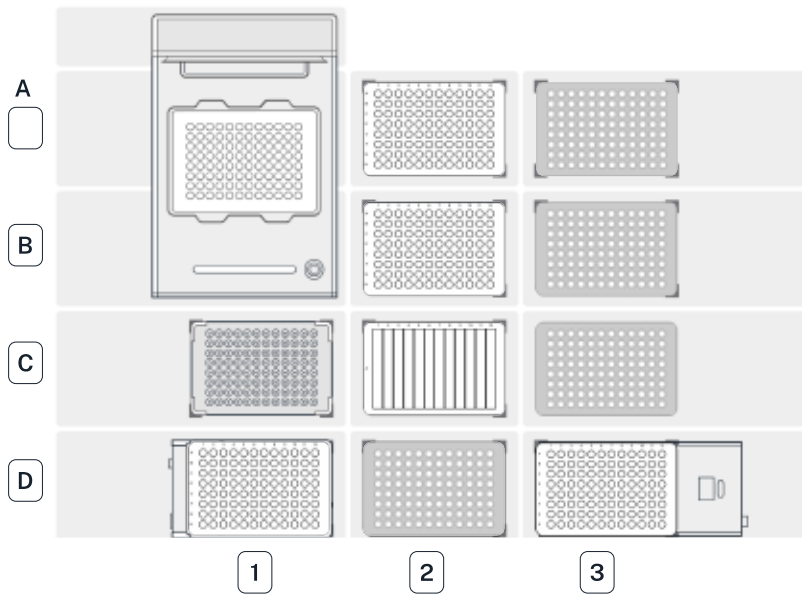
在处理 96 个样本的情况下,我们对比了手动操作和自动化流程所需的时间。对比结果清晰地显示,自动化流程大幅度减少了整个流程所需的时间和手动操作的劳动强度。

为了验证自动化工作流程的效能,我们制备了多种类型的全基因组测序文库,涵盖了大肠杆菌、人类基因组以及混合微生物样本。在这一过程中,我们注意到大肠杆菌的全基因组测序文库展现出了较高的产量以及优异的均匀性(见图3)。

混合微生物样本所制备的 DNA 文库表现出了丰富的产出以及良好的均衡性,其群落特征与预期的、具有不同 GC 含量的物种的群落特征相吻合,这一点在图4中得到了体现。同样,对于人类基因组 DNA 的文库制备,我们也获得了较高的产量和良好的均匀性,如表3所示。

QIAseq® Library Normalizer Kit 替代普通耗时的文库定量方法,简化了文库制备过程,所得文库均一性好(图5)。

Flex甲板初始状态



设备

左侧支架
Flex 8-Channel 1000 µL

右侧支架
Flex 8-Channel 50 µL

延伸支架
Flex Gripper

模块

热循环模块 GEN2 (A1 & B1)

热震荡模块 GEN1 (D1)

温控模块 GEN2 (D3)

环形磁力架 GEN1 (C1)

图 1. QIAseq 工作流程初始甲板布局:两个 Flex 8 通道移液器、Flex 转板抓手和放置在甲板上的模块。

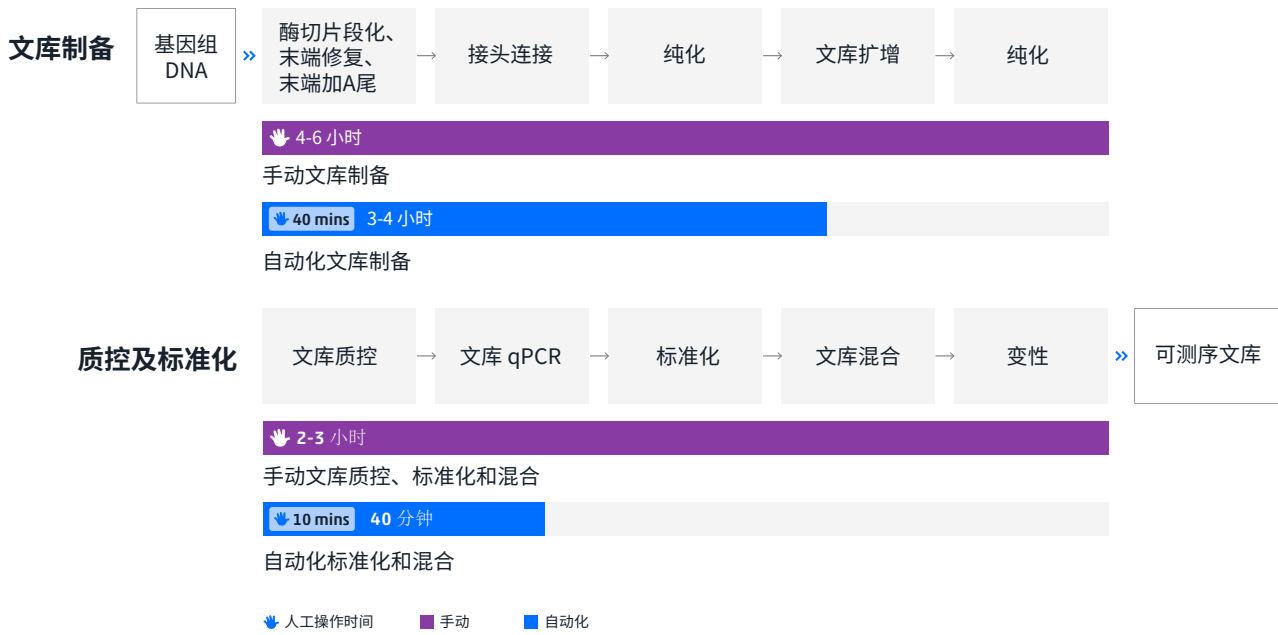
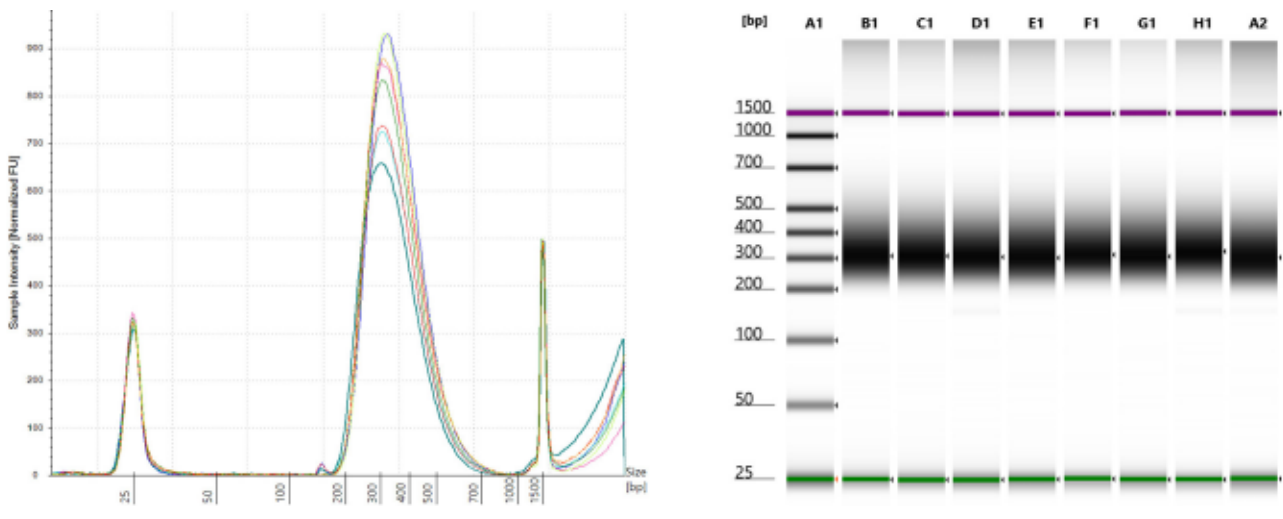
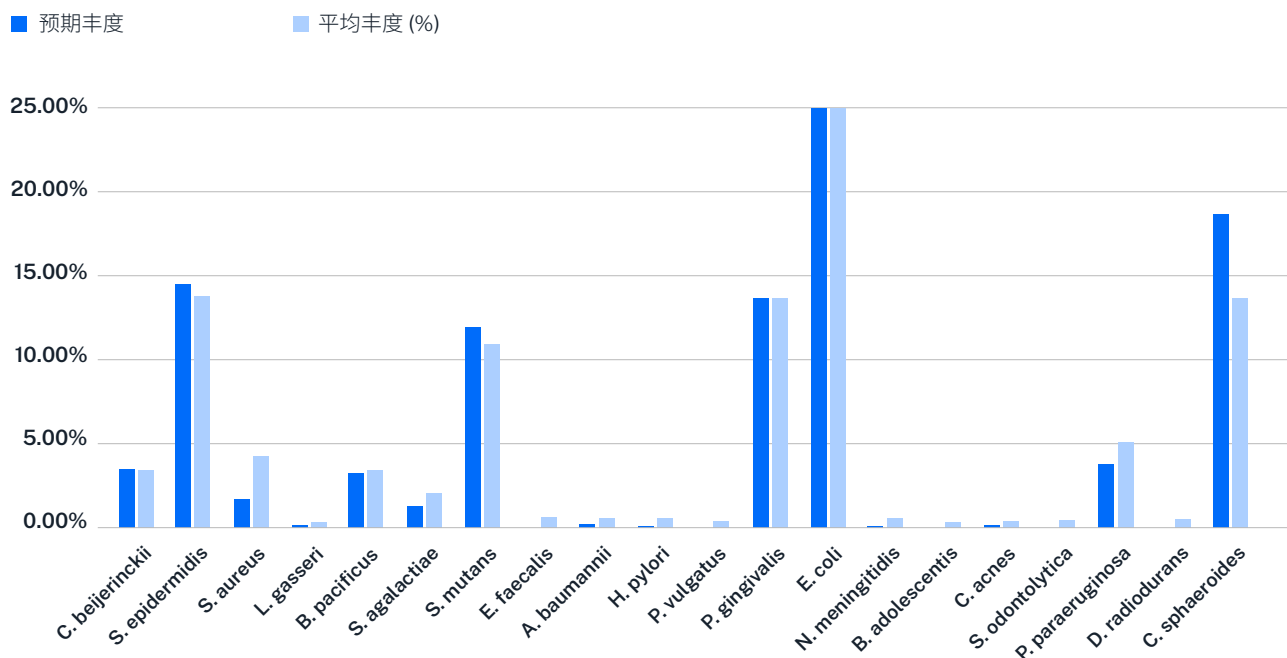


图 2 . 在 Opentrons Flex 上自动化 QIAseq® FX DNA Library Kit 和 QIAseq® Normalizer Kit 工作流程, 可以将总体工作流程时间缩短数小时, 并将实际操作时间缩短至不到 1 小时。时间是基于 96 个样本通量的预估值。



	产出 (ng/μL)	大小 (bp)	MappeZd (%)	指标变异系数	重复率 (%)	错误率 (%)
均值	11.3	264	99.04	0.6	0.06	0.10
变异系数(%)	8.74	2.77	0.05	10.58	-	-

图 3 . 以大肠杆菌基因组 DNA 制备的高产量和高均一性的文库。图中所显示的数据是使用 8 个大肠杆菌 DNA 样本各 100 ng 输入量, 经过 15 分钟的片段化和 6 个循环的扩增后, 生成的文库数据。

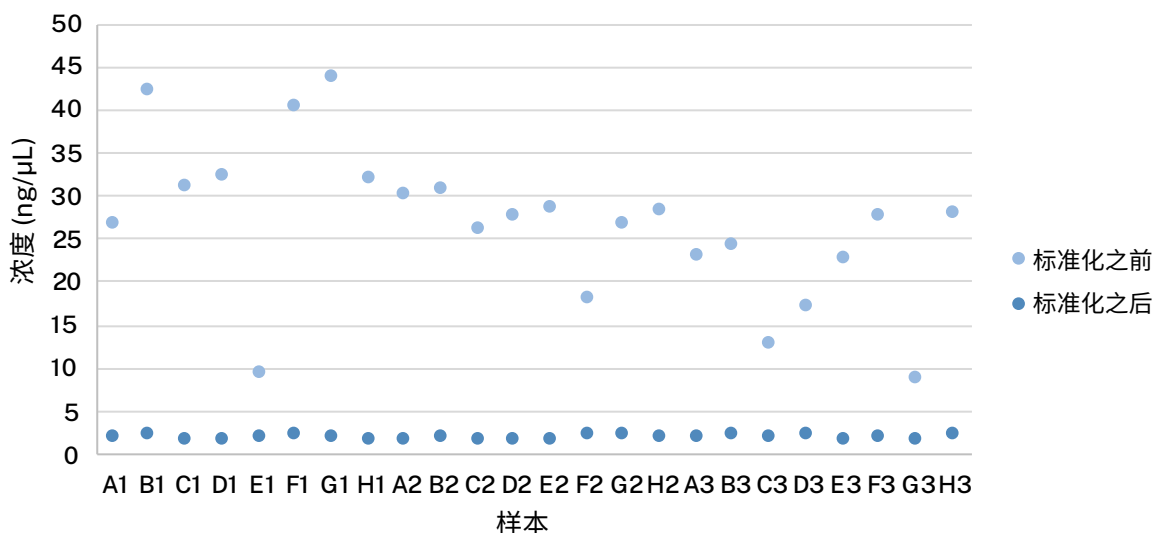


	产出 (ng/μL)	大小 (bp)	Q30 碱基	Total Reads	经过滤芯时的读数 (%)
均值	46.8	258.4	83.0	33.4 M	90.7
变异系数(%)	15.27	11.42	1.16	18.41	2.04

图 4. 在混合微生物样本中, 不同 GC 含量的物种之间的群落特征比较。所显示的数据是从 8 个 ATCCMSA-1003 样品, 使用 1 ng 输入量, 经过 14 分钟的片段化 (含 2.5 μL FX Enhancer)、12 个循环的扩增和 1:10 的接头稀释而生成的。

表 5. 从人类基因组 DNA 制备的高产量和均一的文库。该组数据是使用 Promega 公司提供的 8 各男性人类基因组 DNA 样本生成的, 输入量为 100 ng, 经过 15 分钟的片段化和 6 个循环的扩增。

	产出 (ng/μL)	大小 (bp)	Q30 碱基	Total Reads	经过滤芯时的读数 (%)
均值	13.3	386.3	92.4	40.1 M	96.8
变异系数(%)	16.71	1.05	0.74	19.48	0.32



	输入 (ng/μl)	标准化前文库浓度 (ng/μl)	标准化后文库浓度 (ng/μl)
均值	1.6	26.5	1.8
变异系数 (%)	64.67%	33.85%	13.53%

图 5 . QIAseq® Normalizer Kit 可以从不同输入 DNA 浓度的样本中产生重复性好、标准化的 DNA 文库。为了证明这一点, 我们使用 24 个大肠杆菌 DNA 样本, 输入量范围从 10 到 100 ng (变异系数为 64.67%)。我们使用 QIAseq® FX DNA Library Kit 和 QIAseq® Normalizer Kit (工作流程 B) 处理了这些样本, 并在文库制备后分别取出了标准化前和标准化后的等分样本进行检测分析。分析可知, QIAseq® Normalizer Kit 制备的文库浓度适合测序 (平均为 1.8 ng/μl), 且文库浓度的质量不稳定性下降 (变异系数从 33.85% 降低到 13.53%)。

讨论

在本应用指南中, 我们展示了一种自动化、超高效、简单易用的全基因组测序 (WGS) 文库制备和标准化工作流程。通过将自动化与 QIAseq® FX DNA Library Kit 和 QIAseq® Normalizer Kit 相结合, 与手工相比, 自动化的工作流程的总体和实际操作时间大大缩短。与此同时该工作流程可以制备得到产量高, 质量好的文库。

www.opentrons.com.cn

☎ 0755-26417273

☎ 18098952246

✉ Marketing.china@opentrons.com

